

# 在宅結核患者の早期発見に関する研究

## 喀痰保存条件が塗抹、培養、核酸増幅法検査に与える影響について

### はじめに

1970年代まで日本の結核罹患率は順調に減少してきたが、1980年頃より減少速度に鈍化がみられ、1997年には増加に転じた。なかでも、結核患者中において高齢者が占める割合は増大している<sup>1)</sup>。高齢者では合併症を持つ者も多く、在宅や施設で寝たきりや運動制限状態となり、集団での定期受診を受けることが困難なケースも多い。そのような者が肺結核を発病した場合、出来るだけ早期に発見するためには、菌検査が最も信頼性のある手段となる。その際患者が主治医の指示のもとに在宅のまま随時喀痰を提出し、これを信頼性の高い検査機関に郵送して検査に付し、その結果が主治医に還元されることが可能ならば、これは在宅医療の質的確保という点からひとつの効果的なオプションとなろう。そのような検査方式を可能にするための大きな条件として、喀痰の郵送にかかる所要時間内の保存条件が問題となる。そこで本研究ではこの点について最近普及しつつある菌検出技術を含めた実験的研究を行い、あわせて同様の実験に対するこれまでの報告をレビューした。

### 方法と対象

結核予防会複十字病院に結核として入院し、喀痰塗抹検査で抗酸菌陽性であった患者25人に3日間早朝痰を提出してもらった。提出時期は原則として治療開始前後の連続3日間としたが、実際には治療開始後12日目までにわたる患者もあった。それぞれの喀痰は、喀出当日(0日)とその後保存に入ってから1日後、当日と同3日後、当日と同7日後に、塗抹検査(実験1)、培養検査(小川培地、MGIT)(実験2)、核酸増幅検査(PCR)(実験3)を行い、その結果を比較検討した。保存は冷蔵(4℃)、室温(25℃)の2条件の温度下で行った。検査は全て複十字病院細菌検査室で行い、4人の技師が担当した。

#### 1. 検体処理、保存法

検痰スπιツに提出された早朝痰を検査室にておおよそ3等分し、それぞれ当日検査処理用と、4℃、25℃保存用とした。保存は検査室内の4℃、25℃に設定した保存機内で行った。検体は所定の日にN-アセチル-L-システイン・水酸化ナトリウム(NALC-NaOH)法で前処置を行った。

## 2. 塗抹検査

集菌、蛍光法で行い、菌量は 3+、2+、1+、±、- で表示した。

## 3. 培養検査

検体はそれぞれ 2% 小川培地と液体培地 MGIT で培養した。小川培地では 3 週目、4 週目、8 週目に観察し、MGIT では 6 週間まで観察した。

## 4. 核酸増幅検査

核酸増幅検査は、PCR 法で行った。

## 5. 分析

保存 1、3、7 日後の検出菌量（ないしその程度）は、それぞれ同一検体の当日（0 日）のそれと比較し、<sup>2</sup>検定法を用いて有意差の検討を行った。

# 結果

### 実験 1；塗抹検査法による検出

当日(0 日)と保存後の塗抹陽性率を比較すると、室温、冷蔵保存共に 7 日間までの保存では有意の検出率の低下は認めなかった (Table 1, 3)。塗抹陽性例での菌量を比較しても有意差は認めなかった (Table 2, Table 4)。採取当日の塗抹陽性率が必ずしも 100%ではなく、また保存後にかえって陽性率が増加しているのは、1 回の検体量が少なく、分割する際にむらが生じたためと考えられた。

Table 1：4 保存での塗抹検出率の比較 ( ) %

| 保存期間(日)  | 0       | 1       | 0       | 3       | 0       | 7       |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 塗抹陽性 (%) | 19 (80) | 21 (88) | 18 (82) | 19 (86) | 21 (84) | 21 (84) |
| 塗抹陰性 (%) | 5 (20)  | 3 (12)  | 4 (18)  | 3 (14)  | 4 (16)  | 4 (16)  |
| 計        | 24      | 24      | 22      | 22      | 25      | 25      |

Table 2：4 保存での塗抹陽性例の菌量の比較 ( ) %

| 保存期間(日) | 0      | 1      | 0      | 3      | 0       | 7       |
|---------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
| 3+ (%)  | 5 (26) | 7 (33) | 3 (17) | 0 (0)  | 1 (5)   | 2 (10)  |
| 2+ (%)  | 9 (48) | 7 (33) | 6 (33) | 9 (47) | 12 (57) | 10 (47) |
| 1+ (%)  | 4 (21) | 3 (14) | 7 (39) | 6 (32) | 7 (33)  | 7 (33)  |
| ± (%)   | 1 (5)  | 4 (20) | 2 (11) | 4 (21) | 1 (5)   | 2 (10)  |

|   |    |    |    |    |    |    |
|---|----|----|----|----|----|----|
| 計 | 19 | 21 | 18 | 19 | 21 | 21 |
|---|----|----|----|----|----|----|

Table 3 : 25 保存での塗抹検出率の比較 ( ) %

|          |         |         |         |         |         |         |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 保存期間(日)  | 0       | 1       | 0       | 3       | 0       | 7       |
| 塗抹陽性 (%) | 19 (80) | 20 (83) | 18 (82) | 17 (77) | 21 (84) | 20 (80) |
| 塗抹陰性 (%) | 5 (20)  | 4 (17)  | 4 (18)  | 5 (23)  | 4 (16)  | 5 (20)  |
| 計        | 24      | 24      | 22      | 22      | 25      | 25      |

Table 4 : 25 保存での塗抹陽性例の菌量の比較 ( ) %

|         |        |        |        |        |         |        |
|---------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|
| 保存期間(日) | 0      | 1      | 0      | 3      | 0       | 7      |
| 3+ (%)  | 5 (26) | 5 (25) | 3 (17) | 1 (6)  | 1 (5)   | 3 (15) |
| 2+ (%)  | 9 (48) | 8 (40) | 6 (33) | 8 (47) | 12 (57) | 9 (45) |
| 1+ (%)  | 4 (21) | 5 (25) | 7 (39) | 3 (18) | 7 (33)  | 7 (35) |
| ± (%)   | 1 (5)  | 2 (10) | 2 (11) | 5 (29) | 1 (5)   | 1 (5)  |
| 計       | 19     | 20     | 18     | 17     | 21      | 20     |

#### 実験 2-1 : 液体培地 (MGIT)を用いた培養法による検出

MGIT での培養陽性率は 1 ~ 7 日間保存による検出率の有意の低下はなく、汚染率の差も認めなかった (Table 5, 6)。また室温と冷蔵保存による有意差も認めなかった。培養陽性 24 例中、*M.abscessus* が 1 例、*M.kansasii* が 1 例、*M.tuberculosis* と *M.gordonae* の混合が 1 例あり、残り 21 例は *M.tuberculosis* であった。

Table 5 : 4 保存での MGIT 培養検出率の比較 ( ) %

|          |         |         |         |         |         |         |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 保存期間(日)  | 0       | 1       | 0       | 3       | 0       | 7       |
| 培養陽性 (%) | 23 (96) | 22 (92) | 19 (86) | 18 (82) | 18 (82) | 19 (86) |
| 培養陰性 (%) | 0 (0)   | 1 (4)   | 1 (5)   | 2 (9)   | 2 (9)   | 1 (5)   |
| 汚染 (%)   | 1 (4)   | 1 (4)   | 2 (9)   | 2 (9)   | 2 (9)   | 2 (9)   |
| 計        | 24      | 24      | 22      | 22      | 22      | 22      |

Table 6 : 25 保存での MGIT 培養検出率の比較 ( ) %

|          |         |         |         |         |         |         |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 保存期間(日)  | 0       | 1       | 0       | 3       | 0       | 7       |
| 培養陽性 (%) | 23 (96) | 21 (88) | 19 (86) | 18 (82) | 18 (82) | 19 (86) |
| 培養陰性 (%) | 0 (0)   | 1 (4)   | 1 (5)   | 2 (9)   | 2 (9)   | 0 (0)   |
| 汚染 (%)   | 1 (4)   | 2 (8)   | 2 (9)   | 2 (9)   | 2 (9)   | 3 (14)  |
| 計        | 24      | 24      | 22      | 22      | 22      | 22      |

### 実験 2-2：固形培地（2%小川培地）を用いた培養法による検出

従来の小川培地での培養でも MGIT での培養同様に、保存期間による陽性率、汚染率の有意な変化は認めなかった（Table 7, 8）。培養陽性 22 例中、*M.abscessus* 1 例、*M.kansasii* 1 例、*M.tuberculosis* と *M.gordonae* の混合 1 例を認めた。

Table 7：4 保存での小川培地培養検出率の比較（ ）%

| 保存期間(日)  | 0       | 1       | 0       | 3       | 0       | 7       |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 培養陽性 (%) | 19 (86) | 20 (91) | 15 (83) | 14 (78) | 16 (89) | 17 (94) |
| 培養陰性 (%) | 0 (0)   | 0 (0)   | 0 (0)   | 0 (0)   | 0 (0)   | 0(0)    |
| 汚染 (%)   | 3 (14)  | 2 (9)   | 3 (17)  | 4 (22)  | 2 (11)  | 1 (6)   |
| 計        | 22      | 22      | 18      | 18      | 18      | 18      |

Table 8：25 保存での小川培地培養検出率比較（ ）%

| 保存期間(日)  | 0       | 1       | 0       | 3       | 0       | 7       |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 培養陽性 (%) | 19 (86) | 20 (91) | 15 (83) | 16 (89) | 16 (89) | 14 (78) |
| 培養陰性 (%) | 0 (0)   | 0 (0)   | 0 (0)   | 0 (0)   | 0 (0)   | 0 (0)   |
| 汚染 (%)   | 3 (14)  | 2 (9)   | 3 (17)  | 2 (11)  | 2 (2)   | 4 (22)  |
| 計        | 22      | 22      | 18      | 18      | 18      | 18      |

### 実験 3：核酸増幅検査（PCR法）による検出

入院時の菌株が *M.tuberculosis* と同定された症例のみについて核酸増幅検査を行った。その結果室温、冷蔵共に 7 日間保存期間による陽性率に有意の差は認めなかった（Table 9, 10）。PCR 法で陰性の 3 例の内訳は、2 例が菌少量検体（同検体で塗抹も陰性）で、1 例は *M.gordonae* 混合例であった。

Table 9：4 保存での PCR 法による菌検出率の比較

| 保存期間(日)  | 0       | 1       | 0       | 3       | 0       | 7       |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 塗抹陽性 (%) | 20 (91) | 19 (86) | 17 (85) | 17 (85) | 21 (91) | 21 (91) |
| 塗抹陰性 (%) | 2 (9)   | 3 (14)  | 3 (15)  | 3 (15)  | 2 (9)   | 2 (9)   |
| 計        | 22      | 22      | 20      | 20      | 23      | 23      |

Table 10：25 保存での PCR 法による菌検出率の比較

| 保存期間(日)  | 0       | 1       | 0       | 3       | 0       | 7       |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 塗抹陽性 (%) | 20 (91) | 19 (86) | 17 (85) | 17 (85) | 21 (91) | 21 (91) |
| 塗抹陰性 (%) | 2 (9)   | 3 (14)  | 3 (15)  | 3 (15)  | 2 (9)   | 2 (9)   |
| 計        | 22      | 22      | 20      | 20      | 23      | 23      |

## 考 察

入院時検査で喀痰抗酸菌塗抹陽性が確認された 25 人からの検体を、冷蔵、室温下で 1、3、7 日間保存し、塗抹検査、培養検査、核酸増幅検査を行い、その結果を採取直後(0 日)の検査結果と比較した。25 人の内訳は肺結核が 23 例で大部分を占めるが(1 例は *M.gordonae* の混合感染)、ほかに *M.abscessus* 症、*M.kansasii* 症が各 1 例含まれていた。

塗抹検査においては 7 日間までの保存は、冷蔵、室温下のいずれでも陽性率に影響せず、また菌量の減少も認めなかった。固形培地による培養での菌陽性率もこれまでの報告の多く<sup>2)-8)</sup>が示すように、7 日間までの保存は成績に影響は与えていなかった。

今回、最近の菌の検出、同定検査法あるいは薬剤感受性検査法として繁用されている液体培地を使った培養検査と、核酸増幅検査について併せて試験した。その結果、液体培地 MGIT での培養陽性率、汚染率、核酸増幅法(PCR)による陽性率のいずれにおいても、7 日間までの保存は明らかな影響を与えなかった。PCR 法では死菌であっても陽性となる可能性があると考えられるため、この結果は予想されないこともないが、培養法でも同じ結果であるということは、その程度には生菌が保存されていると考えるべきであろう。また MGIT での培養陽性率、汚染率も固形培地と同様に、7 日間までの保存は影響しなかった。

検査前の喀痰の保存は検査施設が限定されている発展途上国においては結核対策上の重大な課題であった。このため、喀痰採取から検査実施までの保存方法や期間が検査成績に与える影響に関する研究はさまざまに行われてきた<sup>2)-10)</sup>。これらの研究では、固形培地による培養陽性率は 7 日間程度の保存では明らかな影響はない、としているものが多い。塗抹検査に関しては、検体が乾燥しなければ 4 週間から 8 週間の保存後も陽性率が変化しないとしている。

今回我々はこれまで知られていた塗抹、培養検査に加えて、液体培地での培養、核酸増幅法検査においても、喀痰採取後 7 日間の保存後までなら、検査成績は十分信頼できるものであることを確認した。厳密に言えば、本研究では喀痰は入院条件下で採取しているが、在宅条件下では患者の口腔内の雑菌などによる汚染の程度がより高度で、そのため喀痰の変性や腐敗が起こりやすく、これが検査結果に影響することは考えられなくもない。これについては、患者に喀痰採取に先立ってうがいさせることなどの効果の証明と併せて今後の追加的研究の課題としたい。

郵便や各種輸送システムの発達した日本では、在宅患者宅から喀痰を検査機関まで送るという場合、たとえ地方からであっても 3 日程度で配達可能と考えられる。また夏期の一時期を除いて郵便物などの保管が 25 を長時間にわたっ

で越えることはあまりないであろう。したがってこの研究での条件設定は日本で生の喀痰がそのまま運送される条件の模擬として不自然ではない。

今後さらに結核患者における高齢者の割合の増加が予想されるが、在宅で容易にX線検査による検診や臨床的な胸部X線検査を受けにくい場合、患者の呼吸器症状が長引くときには喀痰を検査機関に郵送し検査することは、肺結核の早期発見に有用であると考えられた。

次にこれまでに発表された、同様の実験に対する主な報告を挙げる。

付表．検査実施までの喀痰の保存期間と検出率の関連の研究

| 報告者                                       | 実験場所 | 保存期間    | 結論   |
|---|------|---------|--|
| Sula et al (1960) <sup>2)</sup>           | アフリカ | 15-18 日 | 保存、運搬は培養陽性率に影響する   |
| BMRC (1964) <sup>3)</sup>                 | 香港   | 1-7 日   | 保存期間、運搬は培養陽性率には影響しない   |
| Padmanabha Rao et al (1966) <sup>4)</sup> | インド  | 1-7 日   | 保存期間、運搬は培養陽性率、汚染率には影響しない   |
| East African BMRC (1968) <sup>5)</sup>    | アフリカ | 1-7 日   | 運搬の遅れは培養陽性率、汚染率には影響しない   |
| de Kantor & Podesta (1966) <sup>6)</sup>  | 南米   | 1-30 日  | 7-9 日間までの保存は培養陽性率には影響しない   |
| WHO (1970) <sup>7)</sup>                  | 南米   | 2-4 日   | 4 日間の保存は培養陽性率、汚染率には影響しない   |
| Iwasaki & Hikawa (1979) <sup>8)</sup>     | 日本   | 7-28 日  | 28 日までの保存は塗抹検査に影響しない。汚染率は高くなるが 28 日までの保存でも培養陽性となる                |
| Paramasivan et al (1983) <sup>9)</sup>    | インド  | 3-28 日  | 28 日までの保存は塗抹検査に影響しない。保存 3 日目から培養陽性率は徐々に低下し、7 日目から汚染率が高くなる。       |
| Bamda et al (2000) <sup>10)</sup>         | アフリカ | 7-56 日  | 塗抹陽性率は 8 週間までの保存で低下しない。培養陽性率は 7 日以上保存で徐々に低下し、冷蔵保存の方が室温よりも陽性率が高い。 |

## 謝辞

今回の研究に対し、財団法人在宅医療助成勇美記念財団より助成を頂いたことに深謝致します。

## 文献

1. 結核の統計 2000、結核予防会 2000
2. Sula I, Sundaresan TK, Langerova M(1960): Effects of storage and transport on the cultivability of mycobacteria. Bull Wld Hlth Org 23: 635-651
3. Hong Kong Government Tuberculosis Service, British Medical Research Council (1964): Drug-resistance in patients with pulmonary tuberculosis presenting at chest clinics in Hong Kong. Tubercle (Lond.) 45: 77-95
4. Padmanabha Rao K, Nair SS, Cobbold N, Naganathan N (1966): Some operational factors influencing the utility of culture examination in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Bull Wld Hlth Org 34: 589-604
5. East African/British Medical Research Council Kenya Tuberculosis Survey (1968): Tuberculosis in Kenya: A national sampling survey of drug resistance and other factors. Tubercle (Lond.) 49: 136-169
6. Narvaiz de Kantor I, Podesta D (1966): Lucha antituberc., 41, 1-4
7. Pollack L, Urbancik R, Quinvones, LR(1970): The influence of transport and storage at room temperature on the culture results of Mycobacterium tuberculosis in sputum specimens. WHO/TB 70, 82
8. Iwasaki, T. & Hikawa, Y. (1979): Studies of unfixed smear specimens of sputum for staining and culture of tubercle bacilli. Bull International Union against Tuberc 54: 202-204
9. Paramasivan CN, Narayana ASL, Prabhakar R et al(1983): Effect of storage of sputum specimens at room temperature on smear and culture results. Tubercle, 64, 119-124
10. Banda HT, Harries AD, Boeree MJ et al(2000): Viability of stored sputum specimens for smear microscopy and culture. International J Tuberc Lung Dis 4(3): 272-274